


MIMETIC PEPTIDES FOR EPITOPE OF APOLIPOPROTEIN B-100, CONCATEMER AND MODIFIED PEPTIDES THEREOF, AND VACCINE COMPOSITION COMPRISING THE SAME

Publication number: KR20020018971 (A)

Also published as:

Publication date: 2002-03-09

 ZA200203383 (A)

Inventor(s): JUNG HAE JUNG [KR]; KIM HYU JOON [KR] +

Applicant(s): KIM HYU JOON [KR] +

Classification:

- **international:** C07K14/775; C07K14/435; A61K; (IPC1-7): C07K14/775

- **European:**

Application number: KR20010054005 20010904

Priority number(s): KR20000052055 20000904

Abstract of KR 20020018971 (A)

PURPOSE: Provided are mimetic peptides for epitope of apolipoprotein b-100, their concatemers and modified peptides, and a vaccine composition comprising them. The vaccine composition is used for the treatment of obesity. **CONSTITUTION:** The mimetic peptides for epitope of apolipoprotein B-100 are represented by the SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3. Their concatemers consist of 1-15, preferably 4 mimetic peptides. The vaccine composition for the treatment of obesity contains them and is formulated into an intradermal injection. Their manufacturing method comprises the steps of: inserting DNA coding mimetic peptides for epitope of apolipoprotein b-100, their concatemers and modified peptides, into a vector; transforming a strain with the vector then culturing it; and separating mimetic peptides for epitope of apolipoprotein b-100, their concatemers and modified peptides from the culture.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. 7
C07K 14/775

(11) 공개번호 특2002- 0018971
(43) 공개일자 2002년03월09일

(21) 출원번호 10- 2001- 0054005
(22) 출원일자 2001년09월04일

(30) 우선권주장 1020000052055 2000년09월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인 김호준
경기 안산시 성포동 592 선경아파트 3- 1001

(72) 발명자 김호준
경기 안산시 성포동 592 선경아파트 3- 1001
정해중
서울특별시강동구천호4동299- 10

(74) 대리인 서근복

심사청구 : 없음

(54) 아포지단백질 비- 100의 에피토프에 대한 모조 펩타이드,그들의 연쇄물 또는 변형체와 이들을 함유하는 백신 조성물

요약

본 발명은 비만증 치료용 백신 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 아포지단백질 비- 100(Apolipoprotein B-100)의 에피토프(epitope)에 대한 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 및 변형체를 함유하는 비만증 치료용 백신 조성물에 대한 것이다.

대표도
도 10

색인어
아포지단백질

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a 내지 도 1d는 본 발명의 모조펩타이드 발현 벡터의 구성 요소 및 구조를 나타낸 것으로, 도 1a는 리더 카세트의 구조, 도 1b는 LB 카세트의 구조, 도 1c는 BL 카세트의 구조, 그리고 도 1d는 발현벡터 pBX4의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 모조펩타이드 발현벡터 pBX1 및 pBX4의 제작과정을 나타낸 것이다.

도 3은 LB 카세트의 선별을 위한 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(PAGE) 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 플라스미드 pBlue- BL에 포함된 BL 카세트 DNA를 확인하기 위한 PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 플라스미드 pBX1 및 pBX3에서 삽입체 DNA의 카피수 및 방향을 확인한 PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 발현된 PBI₄ 펩타이드의 동정을 위한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 정제된 PBI₄ 펩타이드를 확인하기 위한 소듐 도데실 설페이트(SDS)- PAGE 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 정제된 PBI₄ 펩타이드의 항- PBI₄ 혈청과의 반응성을 확인한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 마우스에서 PBI₄ 펩타이드에 대해 형성된 항체의 역가를 측정한 간접 효소면역측정법(ELISA)의 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 마우스에서 PBI₄ 백신의 체중 증가 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 11a 및 11b는 시상하부 섭식중추 상해약제의 주사 후, PBI₄ 백신의 주사 시행 여부에 의한 마우스들의 체중변화를 20주째에 비교한 것이다.

도 12는 PBI₄ 백신 주사가 마우스의 혈청 지질 농도에 미친 영향을 확인한 결과이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 비만 치료용 백신 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 아포지단백질 B- 100(Apolipoprotein B- 100)의 에피토프(epitope)에 대한 모조 펩타이드, 그들의 연결체 및 변형체를 함유하는 비만증 치료용 백신 조성물에 대한 것이다.

혈청 지질은 콜레스테롤(cholesterol), 트리글리세리드(TG), 유리 지방산(free fatty acid), 인지질(phospholipid) 등의 다양한 조성으로 구성되며, 아포지단백질과 함께 지단백질을 형성하여 혈액을 통해 운반된다. 이러한 혈청 지질을 운반하는 지단백질 중에서 LDL(low density lipoprotein)은 주로 트리글리세리드와 콜레스테롤의 운반을 담당하고 있는데, 산업화에 따른 식습관 변화 혹은 다른 원인에 의해서 혈중 LDL- 콜레스테롤 수치가 증가하여 발생하는 동맥경화, 관상동맥질환, 심근경색 등의 환자들이 급증하고 있다. 따라서, 이를 해결하기 위한 방법의 하나로, LDL- 콜레스테롤의 수치를 낮추기 위한 연구와 상기 질병들의 발생 과정을 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

지질 대사와 관련된 성인병의 주요 인자인 LDL- 콜레스테롤은 대식세포(macrophage)의 탐식을 통해 HDL(high density lipoprotein)의 형태로 방출되고, 간에서 이를 재활용하거나 혹은 담즙산의 형태로 처리되어 배설되는 경로가 밝혀져 있다(Brown, M. S. and Goldstein, J. L., 1983,Annu. Rev. Biochem.,52: 223- 261).

아포지단백질 B- 100은 이러한 LDL의 주된 단백질 성분이고, VLDL(very low density lipoprotein), 키로미크론(chylomicron)에도 존재하고 있으며, 아포지단백질 B- 100을 통해 LDL이 세포막의 LDL- 수용체에 결합하기 때문에, 혈중에 있는 항체가 아포지단백질 B- 100을 인식하도록 유도한다면 대식세포에 의한 LDL- 콜레스테롤의 제거가 일어날 수 있을 것이다(Dalum I., et al., 1997, Mol. Immunol., 34(16- 17): 1113- 20). 또한, LDL의 표면에 존재하는 아포지단백질 B- 100에 항체와 같은 거대분자가 부착되어질 경우, 혈중 지방질 분해효소인 지단백질 리파아제(lipoprotein lipase)가 트리글리세리드등의 가수분해를 원활히 수행할 수 없으므로 비만의 주요 성분인 유리 지방산 형성이 저해될 수 있다.

최근에는 백신을 이용하여 LDL- 콜레스테롤의 수치를 낮추고 동맥경화를 감소시키기 위한 연구가 마우스와 토끼 등의 다양한 동물을 대상으로 시도되고 있다. 예를 들어, 앨빙 등(Alving, C.R., et al., 1989, Biochem. Soc. Trans., 17(4): 637- 9; Alving, C.R., et al., 1996, J. Lab. Clin. Med., 127:40- 49; Alving, C.R., et al., 1996, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 210: 181- 6)은 콜레스테롤이 산화 및 대사산물에 의해 변형되고 있으며, 경우에 따라 높은 면역원성을 나타낸다고 보고되었다.

또한, 정상인의 혈청 중에 자연발생적으로 콜레스테롤에 대한 항체가 존재하고 있음이 보고된 바 있다(Wu, J.T., and Wu, L.L., 1997, Clin. Lab. Med., 17(3):595- 604, Review). 또한, 토끼를 이용한 동물 실험에서는 콜레스테롤이 포함된 음식을 섭취시킴으로서 고콜레스테롤혈증과 동맥경화를 유도하였는데, 콜레스테롤을 포함한 리포솜을 접종하여 면역화시킨 동물의 경우에는 정상 대조군에 비하여 고콜레스테롤혈증과 동맥경화 경향이 억제되거나 혹은 감소된다고 보고되었다.

이와 같은 콜레스테롤 백신 요법에 의해 유도된 항체는 IgM(immunoglobulin M) 타입으로, VLDL, IDL(intermediate density lipoprotein) 및 LDL과 결합하는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 실험적 사실을 바탕으로 사람에게 나타나는 고지방 식사에 의한 고콜레스테롤혈증 및 동맥경화에 대한 예방 및 치료용 백신의 가능성이 제시되고 있다(Bailey, J. M., 1994, Science, 264:1067- 1068; Palinski, W. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92(3): 821- 5; Wu, R. et al., 1999, Hypertension, 33(1): 53- 9).

본 발명자들은 아포지단백질 B- 100에 대한 미토포 펩타이드가 비만을 효과적으로 예방할 수 있음을 발견하고, 이를 이용한 비만 치료용 백신 조성물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 아포지단백질 B- 100의 에피토프에 대한 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 함유하는 비만증 치료용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 본 발명의 목적은 아포지단백질 B- 100의 에피토프에 대한 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 제공함으로써 달성된다.

본 발명자들은 사람의 아포지단백질 B- 100을 인식하는 모노클로날 항체(MabB23)의 에피토프를 규명하기 위하여 파지(phage)를 이용한 펩타이드 라이브러리 시스템을 이용하였으며, 이때 검색된 펩타이드들은 항체가 인식하는 항원결정기(antigenic determinant)와 구조적으로 유사한 모조 펩타이드들로서, 이들의 아미노산 서열을 이용하여 미토포 펩타이드(minotope peptide)를 합성하였다.

펩타이드 라이브러리 시스템이란 항원 결정기의 형태를 결정하는 방법의 일종으로서, 파지 마이너 코트 단백질(minor coat protein)을 코딩하고 있는 DNA에 무작위 배열의 펩타이드를 코딩하는 염기서열을 삽입하고, 이를 알 에프(RF) DNA에 삽입한 후, 숙주 대장균에 감염시켜 무작위 배열을 펩타이드를 발현시키는 방법이다. 숙주 대장균의 표면으로 발현된 무작위 배열 펩타이드는 항원과 반응시켜 항원 결정기와 유사한 구조를 갖는 펩타이드를 검색하였다.

이러한 미토포 펩타이드를 항원으로 사용하여 마우스에서 면역반응을 유도하여 항혈청을 얻은 결과, 이러한 항혈청이 원래의 아포지단백질 바- 100과 미토포 펩타이드 및 LDL을 동시에 교차 인식하여 예상대로 특이적으로 아포지단백질 바- 100을 인식함을 확인하였다(김치훈, 1997, Phage에 발현시킨 Random Peptide Library를 이용한 Apolipoprotein A- I과 Apolipoprotein B- 100의 생쥐 단클론 항체에 대한 항원 결정기의 확인, 한양대학교 대학원 석사학위논문).

본 발명의 아포지단백질 바- 100의 에피토프에 대한 모조 펩타이드는 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 펩타이드 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

본 발명의 모조 펩타이드는 그의 면역원성을 증가시키기 위하여 연쇄물(concatemer)로서 사용될 수 있으며, 상기 모조 펩타이드가 2개 이상, 바람직하게는 3개 내지 15개 연결된 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는, 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 4개 연결한 것이 가장 바람직하다.

본 명세서에서 상기 모조 펩타이드의 "연쇄물"이란 상기의 모조 펩타이드의 말단이 서로 연결된 중합체를 의미한다.

또한, 본 발명에서 상기 모조 펩타이드의 "변형체"란 아포지단백질 바- 100에 대한 단클론성 및 다클론성 항체가 인식가능한 펩타이드의 아미노산 배열의 각종 변이를 말하며, 예를 들어, 아미노산 배열에 대하여 하나 혹은 그 이상의 아미노산의 치환, 변이, 결손, 추가 및 화학적 치환 등을 의미한다.

본 발명의 다른 목적은 상기 모조 펩타이드, 체그들의 연쇄물 또는 변형체를 암호화하는 DNA를 벡터에 삽입하는 단계; 삽입된 벡터를 사용하여 균주를 형질 전환시킨 후 배양하는 단계; 상기 단계에서 배양된 세포로부터 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 분리하는 단계를 포함하는 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체의 제조 방법을 제공함으로써 달성된다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 아포지단백질 바- 100의 에피토프에 대한 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 함유하는 비만증 치료용 백신 조성물을 제공함으로써 달성된다.

본 발명의 모조 펩타이드, 그들의 연결체 또는 변형체를 사용하여 통상적인 방법에 따라 백신 제형을 제조할 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 활성 성분을 면역 아ジュ반트, 면역보강제, 담체, 부형제 및 희석제와 함께 혼합하거나 이들로 희석하여 제조된 조성물을 캡셀, 새세이(sachet) 또는 기타 용기 형태의 담체 등에 봉입시키는 것이 바람직하다. 이러한 제형들은, 예를 들어, 정제, 환제, 과립제, 분말, 새세이, 엘렉실제, 현탁제, 유제, 액제, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀제, 멸균 주사액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다.

본 발명의 조성물과 함께 사용될 수 있는 면역보조제(adjuvant activity)로는 티 세포(T- cell) 에피토프를 갖는 단백질류, 예를 들면 B형 간염 바이러스 표면항원단백질 등과 같은 단백질류; 알루미늄염, 벤토나이트(bentonite), 라텍스(latex), 아크릴릭 입자(acrylic particles)와 같은 불활성 운반체; 지질과 같은 소수성 항원; 유중수 및 수중유(water-oil, oil-water) 유화액, 다당류같은 축적 형성물(depot former); 피피디(PPD), 폴리 아데닌, 폴리 우라실 등과 같은 T 세포 활성제; 엘피에스(LPS)와 같은 B 세포 미토젠(mitogen)류의 B 세포 활성제; 사포닌(saponin), 리솔레시틴(lysolecithin), 레티날(retinal), 킴 A(quil A), 리포좀 등의 계면 활성제; 대식세포 강화제; 또는 이눌린(inulin), 지모산(zymosan), 엔도톡신(endotoxin), 레바미솔(levamisole), 씨 파르븀(C. parvum) 등의 대안 경로 보충 활성

제(alternate pathway complement activators)가 사용될 수 있다.

본 발명의 백신 조성물에서 "캐리어 단백질"이란 본 발명의 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 혈액을 통해 운반할 수 있는 단백질이나 알루미늄염 같이 제약학적으로 허용되는 물질을 의미한다.

본 발명의 조성물에 사용되는 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 알루미늄염(aluminium salts), 페녹시에틸에 탄을, 물, 생리식염수, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정 질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

또한, 본 발명의 조성물의 제형은 증진제, 항응집제, 운할제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 조성물은 포유 동물에 투여된 후, 1회 또는 수회의 투여에 의해 면역을 완성할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.

본 발명의 비만 치료용 백신 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있고, 바람직하게는 피내(intradermal) 투여의 방법이 이용된다.

본 발명의 백신 조성물은 사람의 경우, 통상적인 1회 투여량은 활성성분인 펩타이드로서 0.1 내지 10 µg /kg 체중, 바람직하게는 0.5 내지 1.0 µg /kg 체중의 범위일 수 있다. 그러나, 활성 성분의 실제 투여량은 면역화 조건, 투여 경로, 환자의 상태, 연령, 성별 및 체중 등의 여러 관련 인자를 고려하여 결정될 수 있으며, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

본 발명의 백신 조성물의 기본적인 약리효과는, 본 발명의 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 항원으로 인식하여 형성된 인간의 항체가 LDL 표면의 B- 100 에피토프에 결합하여 리파아제의 작용 부위를 입체적으로 차폐(steric hindrance)함으로써 비만의 주요 인자인 유리 지방산 생성을 저해하여 비만증의 예방 및 치료 효과를 나타낸다.

또한, 본 발명의 백신 조성물은 아포지단백질 B- 100 에피토프의 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 항원으로 인식하여 생성된 인간의 항체가 LDL 표면의 B- 100 에피토프에 결합함으로써 오폐화(opsonization) 작용을 야기하여 LDL이 대식세포에 의해 쉽게 탐지되어 제거되게 하는 기작을 통하여 고지혈증 억제 효과를 나타낸다.

본 발명의 백신 조성물의 또 다른 약리효과는, LDL 표면의 아포지단백질 B- 100의 에피토프에 본 발명의 아포지단백질 B- 100 에피토프의 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 항원으로 인식하여 생성된 인간의 항체가 결합함으로써, LDL이 세포 표면의 LDL 수용체와 특이적으로 결합하는 것을 방해하여 콜레스테롤 및 유리 지방산 등의 지방질이 세포내에 축적되는 것을 방지하여 비만증 예방 및 치료 효과를 나타낸다.

이하에서 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1>

올리고뉴클레오타이드의 합성 및 어닐링

원하는 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 겐메드 신테시스사(Genemed Synthesis, Inc.; San Francisco, CA, USA)에 의뢰하여 합성하였다. 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 인산기를 부착시키기 위하여, 100 pmol/µl 올리고뉴클레오타이드 50 µl에 10 mM ATP 10 µl, 10 U/µl T4 폴리뉴클레오타이드 카이네이즈(Takara, Otsu, Japan) 3 µl 및 10× 카이네이즈 완충액 7 µl를 섞어 총 반응 부피를 70 µl로 하여 37°C에서 2시간동안 반응시켰다.

또한, 올리고뉴클레오타이드를 서로 상보적 관계에 있는 올리고뉴클레오타이드와 어닐링(annealing) 시키기 위하여, 카이네이즈 처리된 각각의 올리고뉴클레오타이드를 10 μ l씩 섞고 80°C에서 5분간 가열시킨 후 실온이 될 때까지 서서히 냉각시켰다.

< 실시예 2>

연결반응

벡터 DNA 1 μ l, 삽입체 DNA 5 μ l, T4 DNA 연결효소 (NEB, Beverly, MA, USA) 1 μ l, 10X 효소 반응 완충액(NEB, Beverly, MA) 1 μ l 및 증류수 2 μ l를 혼합하여 연결반응액을 만들고, 16°C에서 밤새 반응시켰다.

< 실시예 3>

아포지단백질 바- 100에 대한 모조 펩타이드(PB1) 발현용 벡터(pBX)의 제조

단계 1: 벡터의 설계

모조 펩타이드 발현용 벡터는 기본적으로 리더 카세트와 PB1 펩타이드 유전자를 포함하게 되며, 하나의 PB1 유전자를 포함하는 벡터(플라스미드 pBX1)는 도 1a와 같은 리더 카세트를 pQE30 벡터(Qiagen, Hilden, Germany)의 SalI 및 BamHI 위치에 클로닝하고 이렇게 제작된 플라스미드의 HindIII 및 SalI 위치에 도 1b와 같이 정지코돈이 포함된 PB1 펩타이드 유전자(LB 카세트)를 서브클로닝하여 제작하였다.

한편, 다수의 PB1 펩타이드 유전자가 연결된 유전자를 포함하는 벡터는 상기 플라스미드 pBX1의 SalI 위치에, 도 1c와 같이 서로 연결될 수 있도록 고안된 PB1 펩타이드 유전자(BL 카세트)를 SalI과 XhoI으로 절단한 후 한 개 이상 삽입하여 제작하였다.

단계 2: PB1 모노머(monomer) 펩타이드 발현 벡터(pBX1)의 제조

실시예 1 및 2의 방법에 따라 서열번호 10 및 11을 갖는 올리고뉴클레오타이드들을 합성한 후 어닐링시켜 도 1a와 같은 리더 카세트를 제작한 후, SalI 및 BamHI으로 절단한 pQE30 벡터(Qiagen, Hilden, Germany)와 연결하여 플라스미드 pQE- Leader를 제조하였다. pQE30 시스템을 이용하여 단백질을 발현하게 되면 정제를 용이하게 할 목적으로 목적 단백질의 N- 말단에 6개의 히스티딘 잔기가 추가로 붙게 되는데, 이러한 추가 아미노산을 최소한으로 줄이기 위하여 상기 리더 카세트의 서열은 엔테로카이네이즈 인식 부위(DDDDKI; 서열번호: 12)를 갖도록 고안되었다.

한편, 도 1b의 LB 카세트(서열번호 13 및 14)를 제조하기 위해, 실시예 1과 같은 방법으로 서열번호 4 내지 7의 네 가지 올리고펩타이드를 합성한 후, 인산화시키고, 각각 상보적인 올리고뉴클레오타이드와 어닐링시켰다. 이어서, 어닐링된 올리고펩타이드 40 μ l에 1U/ μ l T4 DNA 연결효소 3 μ l, 10X 효소 반응 완충액 5 μ l 및 증류수 2 μ l를 혼합하여 연결 반응액을 만들고, 16°C에서 밤새 반응시켜 올리고뉴클레오타이드들을 연결하였다.

반응이 완료된 후, 반응액을 20% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하고 EtBr 염색으로 52 bp의 올리고뉴클레오타이드(LB 카세트)를 확인하였다(도 3).

도 3에서, M열은 20 bp 래더(ladder) DNA 크기 표지이고, 제1열은 연결반응액이다. QIAEXII 겔 추출 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 겔로부터 LB 카세트를 회수한 후 Hind III 및 Sal I으로 절단하였다.

상기에서 제조된 플라스미드 pQE- Leader를 Hind III 및 Sal I으로 절단한 후 실시예 2의 방법으로 상기에서 제조된 LB 카세트와 연결하여 PB1 모조 펩타이드 발현 벡터를 제조하였다. 제조된 벡터를 pBX1이라 명명하였으며 이러한 벡터에서 발현되는 펩타이드는 PB1₁ 펩타이드로 명명하였다(도 2 참조).

단계 3: PB1 펩타이드 연쇄물 발현 벡터의 제조

도 1c의 BL 카세트(서열번호 15 및 16)를 제조하기 위해, 실시예 1과 같은 방법으로 서열번호 4, 5, 8 및 9의 네 가지 올리고뉴클레오티드를 합성한 후 인산화시키고, 각각 상보적인 올리고뉴클레오티드와 어닐링시켰다. 이어서, 단계 2에서와 같이 올리고뉴클레오티드들을 연결한 후 20 % 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하여 51 bp 크기의 올리고뉴클레오티드(BL 카세트)를 확인하였다. QIAEXII 추출 키트를 이용하여 겔로부터 BL 카세트를 회수하여 Sal I 및 Xho I 으로 절단하였다.

한편, 벡터 pBluescript II SK(Stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.)를 SalI 및 XhoI으로 절단한 후 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동후 QIAEX II 겔 추출 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 절단된 벡터를 회수하였다. 이때 회수된 벡터 DNA는 원래 사용된 DNA양의 5배 정도까지 농축되었다.

5 µl의 BL 카세트 DNA 및 상기에서 준비된 절단된 벡터 DNA 1 µl를 사용하여 실시예 2와 같이 연결반응을 실시하여 플라스미드 pBlue- BL을 얻었다.

플라스미드 pBlue- BL을 Sal I 및 Xho I으로 절단하여 BL 카세트를 분리해낸 후, 이를 단계 2에서 제조된 벡터 pBX1의 Sal I 위치에 삽입하여 플라스미드 pBX2를 제조하였다. 또한, 벡터 pBX1의 Sal I 위치에 삽입되는 BL 카세트의 수를 2개, 3개로 변화시켜 플라스미드 pBX3 및 pBX4를 제조하였다(도 2 참조).

플라스미드 pBX2, pBX3 및 pBX4로부터 발현되는 펩타이드는 PB1 펩타이드가 2개, 3개, 4개씩 각각 연결된 것이며, 이들은 PB₁₂, PB₁₃ 및 PB₁₄ 펩타이드로 각각 명명하였다.

단계 4: 삽입체의 확인

플라스미드 pBlue- BL로 대장균 (E. coli M15[pREP4]; Qiagen사, Hilden, Germany)를 형질전환시킨 후 평판 아가 배지(1 % 아가로를 첨가하여 겔화시킨 LB 배지)에 접종하고 37°C에서 16 시간 동안 배양하여 콜로니를 형성시켰다. 평판 아가배지에서 얻은 콜로니를 10 M의 LB 배지에 접종하여 37°C 진탕 배양기에서 16시간 동안 배양한 후, DNA 정제 시스템(WizardTM PLUSSI DNA miniprep DNA purification system; Promega, Madison, WI, U.S.A.)을 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분리된 플라스미드를 제한효소 Sal I 및 Xho I을 이용하여 37°C에서 1시간동안 절단시킨 후 20% PAGE를 통하여 분석하였다(도 4). 도 4에서, M열은 20 bp 래더(ladder) DNA 크기 표지이고, 제 1열은 단계 3에서 얻은 연결된 올리고뉴클레오티드 산물이고, 제2열은 단계 3에서 20% PAGE로 분리한 BL 카세트 DNA이고, 제3열은 제한효소로 처리된 재조합 플라스미드 pBlue- BL이다. 도 4로부터 플라스미드 pBlue- BL이 BL 카세트 DNA를 포함함을 알 수 있다.

한편, 발현벡터내의 삽입체의 카피수 및 방향을 확인하기 위하여, 플라스미드 pBX1 및 pBX3로 대장균 (E. coli M15[pREP4])를 각각 형질전환시킨 후 상기와 같이 플라스미드 DNA를 분리하였다. 분리된 플라스미드를 제한효소 Sal I 및 Hind III로 절단한 후 20% PAGE를 통하여 분석하였다(도 5). 도 5에서, 제1열은 20 bp 래더 DNA 크기 표지이고, 제1열 및 제3열은 pBX1내의 LB 카세트만 확인되어 BL 카세트가 삽입되지 않은 플라스미드이고, 제2열은 pBX3내의 3 카피 삽입체로 1 LB 카세트 + 2 BL 카세트의 올바른 삽입을 확인할 수 있으며, 제4열은 1 LB 카세트 + 2 BL 카세트가 역 방향으로 삽입된 양상이다. 따라서, 형질전환 균주를 확인하는데 있어서 도 5의 결과로부터 pBX 벡터에 B 카세트(BL 또는 LB 카세트) 몇 개가 어떠한 방향으로 삽입되었는가를 확인할 수 있다.

또한, 위자드 플러스 DNA 미니프렙 키트(WizardTM PLUS DNA miniprep kit)를 이용하여 정제한 플라스미드 DNA에 삽입된 B 카세트의 서열을 시퀀나제(Sequenase(ver 2.1)) DNA 서열분석 키트(Amersham, Cleveland, UK)를 이용하여 분석한 결과 목적하는 서열과 일치함을 확인하였다.

< 실시예 4>

대장균을 이용한 PB₁₄ 펩타이드의 발현 및 정제

단계 1: PB₁₄ 펩타이드의 발현 확인

재조합 PB1₄ 펩타이드의 발현을 확인하기 위하여, pBX4 벡터로 형질전환된 대장균 M15[pREP4]와 대조군으로서 형질전환되지 않은 대장균 M15[pREP4] 및 pQE30 벡터로 형질전환된 대장균 M15[pREP4]를 각각 앰피실린 (100 µg/M2)과 카나마이신 (25 µg/M2)이 함유된 LB 아가(agar) 플레이트에 도말하여 콜로니를 얻은 다음 앰피실린 (100 µg/M2)과 카나마이신 (25 µg/M2)이 함유된 LB 배양액에 접종하여 밤새 배양하였다. 배양액을 600 nm에서 흡광도가 0.5 - 0.7 정도가 되도록 37°C에서 1시간 정도 진탕배양한 후, IPTG(isopropyl- thio- β - galactopyranoside)를 최종적으로 1 mM 농도가 되도록 가하여 재조합 단백질의 발현을 촉진시키며, 37°C에서 5시간 동안 추가 배양하였다. 배양액 1 M2를 취하여 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 펠릿을 얻은 후 2X SDS 시료 완충액 [100 mM Tris· Cl pH 6.8, 20% 글리세롤 (w/v), 4% SDS (w/v), 2% 2- 머캅토에탄올, 0.001% 브로모페놀블루] 50 µl에 녹여 SDS- PAGE 시료로 사용하였다. 전기 영동 직전에 준비한 시료를 95°C에서 5분간 가열한 후 젤에 10 µl를 로딩하고, 20 mA로 5시간 동안 전기영동을 수행하였다(Mighty SmallIII, Hoefer, USA). 사용한 스테킹 겔과 분리 겔의 아크릴아마이드 농도는 각각 5%, 15%이었고, 표준 단백질로는 미리 염색된 표준 SeeBlue (250 kDa~ 4 kDa; NOVEX, San Diego, CA, U.S.A.)와 광범위 표준 Mark12 (200 kDa~ 2.5 kDa)를 사용하였다. 전기 영동이 끝난 후 쿠마씨 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue R- 250)를 사용하여 1시간 동안 염색하고, 다시 탈색용액(5% MeOH, 7% 아세트산)으로 10시간 동안 탈색하였다.

또한, 발현된 펩타이드가 PB1₄ 펩타이드인지 확인하기 위하여, 상기 겔에서 분리된 밴드를 니트로셀룰로스 막에 옮긴 후 항- PBI 혈청(미국 Bio- Synthesis, Inc.(Lewisville, TX, USA)에 의뢰하여 합성한 PB1 펩타이드를 토끼에 면역시켜 생산함)과 반응시켜 웨스턴 블롯팅을 실시하였다(도 6). 도 6에서, M열은 미리 염색된 표준 SeeBlue 표지이고, 제1열은 형질전환되지 않은 대장균 M15[pREP4]의 배양액이고, 제2열은 pQE30 벡터로 형질전환된 대장균 M15[pREP4]의 배양액이며, 제3열은 pBX4 벡터로 형질전환된 대장균 M15[pREP4]의 배양액이다.

도 6에서 보는 바와 같이, 재조합 PB1₄ 펩타이드는 항- PB1 마우스 혈청과 특이적으로 면역학적 반응을 나타내었다.

단계 2: 발현된 펩타이드의 용해도 확인

pBX4 벡터로 형질전환시킨 대장균 M15[pREP4]를 단계 1과 같이 배양한 다음, IPTG로 유도한 지 3시간 후 배양액 10 M2를 취한 후 원심분리하여 세포를 수확하였다. 세포 펠릿에 천연형 단백질을 얻기 위한 세포 용해 완충액(300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM 이미다졸, pH 8.0) 5 M2를 넣은 후, 냉각시킨 후 세포를 파쇄하기 위하여 30초씩 10 사이클, 사이클 사이에 1분 30초간 중지하면서 초음파처리를 수행하였다. 4°C, 10,000 xg에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 가용성 단백질이 들어있는 조추출물 A로 사용하였으며, 남아있는 펠릿은 불용성 단백질이 들어있는 조추출물 B로 사용하였다. 각각의 시료에 2X SDS 시료 완충액을 섞어 95°C에서 5분간 끓인 후 단계 1에서와 같은 방법으로 SDS- PAGE를 수행하였다. 그 결과 PB1₄ 펩타이드는 불용성분획인 조추출물 B에 포함되어있어, 가용성분획인 조추출물 A와 분리정제가 가능하다는 것을 확인하였다.

단계 3: PB1₄ 펩타이드의 정제

< 단계 3- 1> 친화성 크로마토그래피

단계 1에서 발현이 확인된 펩타이드를 정제하기 위하여 his tag 단백질을 Ni- NTA 수지를 사용하였다. 이 수지를 이용한 친화성 크로마토그래피는 수지에 충전되어있는 Ni²⁺과 단백질에 발현되는 his 잔기의 친화력을 이용하여 원하는 단백질을 쉽게 정제할 수 있는 방법이다.

먼저 1 ℓ 의 LB 배지에 pBX4로 형질전환된 대장균 M15[pREP4]의 밤새 배양한 배양액을 50:1로 접종하고, 600 nm 에서 흡광도가 0.6이 될 때까지 37°C에서 배양하였다. IPTG를 최종 1 mM 농도로 가하고 5시간 동안 배양한 후 6,000 xg에서 30분간 원심분리하여 세포 펠릿을 얻어 - 70°C에서 밤새 보관하였다. 얼음에서 녹인 펠릿에 습중량 1 g당 용해 완충액(300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM 이미다졸, pH 8.0) 5 Mℓ를 넣어 잘 녹였다. 단계 2에서와 같은 방법으로 초음파처리하여 세포를 파쇄하고, 상온, 10,000 xg에서 30분간 원심분리하여 펠릿(단계2의 조 추출물 B)을 얻었다. 여기에 세포를 용해시키고 세포 내부에 있는 단백질을 변성시키기 위한 완충액(8 M 우레아, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M tris- HCl, pH 8.0)을 남아 있던 상층액 부피와 동일하게 섞어 펠릿을 녹였다. 이때 충분히 펠릿을 녹이기 위하여 초음파처리를 약간 실시하여 부유물이 보이지 않게 하였다. 이렇게 얻어진 추출물에 존재하여 8 M 우레아 완충액에도 녹지 않는 세포 찌꺼기를 제거하기 위하여 8,000 rpm에서 30분간 원심분리를 실시하였다. 여기서 얻어진 상층액에 세포 용해물 4 Mℓ당 Ni- NTA 수지 1 Mℓ를 섞고, 4°C, 200 rpm으로 2시간동안 회전 진탕기로 진탕하면서 결합시켰다.

충전할 컬럼(size: 내경 2 cm x 높이 2.7 cm)을 준비하여 아래쪽을 캡으로 막고, 조심스럽게 결합시킨 혼합물을 넣고 수지가 가라앉으면, 캡을 열어 유출물을 받았다. 완충액(8 M 우레아, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M tris- HCl, pH 8.0) 20 Mℓ 및 Ni- NTA 수지에 비특이적으로 결합되어있는 단백질을 제거하기 위한 완충액(8 M 우레아, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M tris- HCl, pH 6.3) 20 Mℓ로 순차적으로 컬럼을 세척한 후, his tag 결합 단백질을 용출하기 위한 완충액(8 M 우레아, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M tris- HCl, pH 5.9)을 5 Mℓ씩 2회, 그리고 좀 더 강한 pH 조건을 주어 Ni- NTA 수지에서 원하는 단백질들이 용출될 수 있도록 하기 위한 완충액(8 M 우레아, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M tris- HCl, pH 4.5)을 5 Mℓ씩 4회 흘려보내 단백질을 용출하였으며, 용출을 확인하기 위하여 15 % 아크릴아마이드 겔을 사용하여 SDS- PAGE를 수행하였다(도 7). 도 7에서, M열은 미리 염색된 Seeblue 크기 표시이고, 제1열은 정제된 PB1₄ 펩타이드이다.

이렇게 정제된 펩타이드가 본래의 구조(conformation)를 갖도록 PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L)를 사용하여 투석을 수행하였다. 사용한 투석 튜브의 분자량 제한 크기(cut- off size)는 3,500이며, 튜브는 Na₂HCO₃, EDTA를 포함하는 완충액으로 10분 끓이고 증류수로 세척한 다음 EDTA로 다시 10분 끓여 활성화시켰다. 먼저 2 M 우레아를 포함한 PBS 3 ℓ 로 5시간동안 투석한 후 PBS 5 ℓ 씩으로 2 회, 밤새 투석하였다.

< 단계 3- 2> 소수성 크로마토그래피

단계 3- 1에서 얻어진 PB1₄ 펩타이드의 순도를 높이기 위해 소수성 크로마토그래피를 실시하였다.

단계 3- 1에서 Ni- NTA 수지에서 용출되어 나온 PB1₄ 펩타이드 용액에 10% 황산암모늄을 조금씩 가하여 녹이며 pH를 7.0으로 맞추었다. 10% 황산암모늄이 충분히 녹은 후에 3시간 이상을 방치하고 페닐 세파로즈 컬럼[충전물: Phenyl sepharose Fast Flow resin(Pharmacia사, Sweden); 컬럼 size: 1 cm(id)x 3 cm(h)]에 로딩하였다. 용출액(8 M 우레아, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M tris- HCl, pH 6.3)을 0.5 Mℓ/분의 유속으로 흘려주면서 황산암모늄 농도구배를 10 %에서 0 %까지 역으로 걸어주며 용출한 각각의 분획들을 SDS- PAGE를 통하여 확인하고, PB1₄ 펩타이드가 모여있는 분획들을 모아 PBS 완충액에 투석하여 탈염시켰으며 동시에 변성제인 우레아도 제거하였다.

< 단계 3- 3> His tag의 제거

투석 완충액으로서, 정제된 his tag 단백질에서 변성제 및 이미다졸 등을 제거하고 엔테로키네이즈가 활성을 나타낼 수 있는 조성을 갖는 완충액(50 mM NaCl, 20 mM tris- HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.4)에 2 M 우레아를 가하여 완충액을 만들었다. 단계 3- 2에서 얻은 투석된 PB1₄ 펩타이드를 우레아가 들어있는 상기 완충액에서 투석하여 탈염하면서 우레아의 농도를 점진적으로 낮추어 주었다. 이렇게 완충액 교환된 PB1₄ 펩타이드가 들어있는 용액에 엔테로키네이즈를 3 단위/Mℓ로 가하여 23°C에서 배양하며 1시간 간격으로 시료를 취해 SDS- PAGE로 밴드를 확인하여 his tag이 제거된 PB1₄ 펩타이드 (PB1₄^{-his} 펩타이드)의 생성량을 측정하였다.

< 단계 3- 4> 이온교환크로마토그래피

엔테로키네이즈 처리에 따라 생성된 불필요한 단백질 및 펩타이드들을 제거하기 위해서 이온 교환 크로마토그래피를 실시하였다.

단계 3- 3의 PB1₄- his 펩타이드 시료를 완충액(2 M 우레아, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M tris- HCl, pH 7.0)에서 투석하여 완충액을 충분히 교환하였으며, DEAE 세파로즈 수지(Pharmacia, uppsala, Sweden) 컬럼에 투석된 시료를 로딩한 후 완충액(50 mM 인산나트륨 완충액, 2 M 우레아, pH 7.0)으로 컬럼을 평형화하고 완충액(50 mM 인산나트륨 완충액, 2 M 우레아, 1 M NaCl)을 이용하여 0에서 1 M까지 NaCl 농도구배를 걸어주어 펩타이드를 용출하였다(유속: 0.5ml/분). 또한, 각각의 분획을 몇 개의 구역으로 나누어 합친 후 각각을 농축하여 SDS- PAGE로 PB1₄- his 펩타이드의 존재를 확인하였다.

단계 4: PB1₄ 펩타이드의 정량

단계 3과 같은 방법을 통해 정제된 PB1₄ 펩타이드의 양은 마이크로 BCA 시약(micro BCA reagent; Pierce, Rockford, USA)를 이용한 비색법으로 측정하였다.

단계 5: 재조합 PB1₄ 펩타이드의 특성 확인

단계 3에서 정제된 PB1₄ 펩타이드의 순도 및 PB1₄ 펩타이드를 항원으로 이용하여 얻어진 항혈청과의 반응성을 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 이때 발색은 ECL(Amersham사, Cleveland, UK)을 사용하였다.

SDS- PAGE(실시예 2, 단계 1)가 완료된 후 젤을 니트로셀룰로즈 페이퍼(nitrocellulose paper)와 함께 전달 완충액(조성: 0.3% tris, 1.5% glycine, 20% methanol)으로 일정전압 60 V에서 3시간 동안 반응시켜 젤상의 밴드를 니트로셀룰로즈 페이퍼로 이동시킨 다음, 5 M의 블로킹 용액(TBS pH 7.5, 5% 탈지분유 (w/v), 0.02% Tween 20)으로 1시간 30분간 처리하여 펩타이드 밴드 이외의 다른 부분을 블로킹하였다. TTBS(0.1% Tween 20 함유 tris 완충 식염수)를 이용하여 15분, 5분, 5분간 3회 세척한 후, 1차 항체로서 PB1 펩타이드로 유도된 항- PB1 펩타이드 혈청(실시예 2, 단계1 참조)을 블로킹 용액에 1:5000로 희석한 용액을 가하여 1시간 30분 동안 반응시켰다. 또한, 정제된 PB1₄ 펩타이드의 순도를 확인하기 위해서는 1차 항체로서 PB1₄ 펩타이드로 유도된 항- PB1₄ 펩타이드 혈청(실시예 3)을 1:5000으로 희석하여 사용하였다. TTBS로 15분, 5분, 5분간 3회 세척한 후 알칼리성 포스파타제- F(ab')₂- 염소 항- 마우스 IgG(H+L)(Zymed, San Francisco, CA)를 블로킹 완충액에 1:1000으로 희석시킨 용액과 1시간 30분 동안 상온에서 반응을 시켰으며, 다시 TTBS로 3회 세척 후 발색기질인 BCIP/NBT (5- 브로모- 4- 클로로- 3- 인돌릴 포스페이트/니트로 블루 테트라졸리움)(Sigma)로 발색시켰다. 발색반응의 종결은 TTBS 용액을 사용하여 BCIP/NBT 용액을 제거하여 수행되었다. 웨스턴 블롯팅 결과, 발현된 PB1₄ 펩타이드가 항- PB1₄ 혈청에 의해 인식될 수 있음을 확인하였다.

ECL의 경우에는 니트로셀룰로즈 종이 대신에 PVDF 막(Gelman Science의 BioTrace ??)을 사용하였다. 또한, 1차 항체를 1:10000으로 희석하여 사용하였으며, 2차 항체로서 HRP- 결합된 토끼 항- 마우스 IgG(Pierce, Rockford, IL, U.S.A.)를 1:10000으로 희석하여 사용하였다. 발색 반응은 ECL+ Plus 웨스턴 블롯팅 검출 시약(Amersham)에 있는 용액 A 1 M당 용액 B를 25 µl를 섞어 사용하였다. 충분히 발색되었을 때 막을 필름 카세트에 넣어 5초, 10초, 20초, 30초간 필름에 노출시켜 밴드를 검출하였다(도 8). 도 8에서, M열은 ECL 검출 표지(Gibco BRL)이고, 제1열은 PB1₄ 펩타이드이다. 도 8의 결과로부터 발현된 PB1₄ 펩타이드가 항- PB1₄ 혈청에 의해 인식될 수 있음을 알 수 있다.

또한, 프로틴 G 컬럼(protein G column, 입수처:Bio- Rad, USA)을 이용하여 혈청으로부터 PB1₄ 펩타이드에 대한 항체를 정제하여 웨스턴 블롯팅을 실시한 경우 혈청을 직접 이용한 결과와 동일한 결과를 확인할 수 있었다.

< 실시예 5>

항- PB1₄ 펩타이드 마우스 항체의 제조

본 실시예에서 사용된 PB1₄ 펩타이드는 실시예 2의 단계 3- 3에서 his tag이 제거된 PB1₄ 펩타이드(PB1₄- his)이다.

단계 1: PB1₄ 펩타이드와 OVA의 결합

실시에 2의 단계 3에서 정제된 PB1₄ 펩타이드 용액에 캐리어(carrier) 단백질로 오브알부민(ovalbumin)을 물비가 약 1:10이 되도록 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 방치하였다. PB1₄ 펩타이드 및 오브알부민의 혼합 용액에 동일 부피의 2%(v/v) 글루타르알데히드 수용액을 혼합하고 4°C에서 계속 교반하면서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 정지를 위해 글리신을 최종 농도가 0.2 M이 되도록 첨가하였다. 4°C에서 계속 교반하면서 1시간 동안 반응시킨 다음, MWCO 12000 - 14000인 투석 막(SpectrumTM, Rancho Dominguez, CA, U.S.A.)을 통하여 PBS 완충액에서 잔여 글루타르알데히드를 제거하였다.

단계 2: 마우스의 면역화

단계 1에서 얻은 결합된 펩타이드를 농축하여 마우스 면역화에 사용하였다. 이때 사용된 항원 양은 결합하기 이전 PB1₄ 펩타이드 양이 5 µg 이 주사될 수 있도록 준비하였으며 동량의 보조제와 충분히 유화하여 복강에 0.2 ml씩 주사하였다. 1차 주사는 보조제로서 프로인트 완전 보조제(Complete Freund's Adjuvant; CFA)를 사용하였으며 2주 간격으로 프로인트 불완전 보조제(Incomplete Freund's Adjuvant; IFA)를 사용하여 2회 더 부스팅을 실시하였다. 대조군 마우스에게는 BSA를 동일한 방법으로 주사하였다.

마지막으로 부스팅한지 5일 후 심장에서 1 ml의 혈액을 채취하여 37°C에서 30 분 동안 정치하여 응혈(clotting)을 실시하였다. 이후 4°C 2,500 xg에서 30분간 원심분리하고, 파스퇴르 피펫을 이용하여 혈병(clot)을 분리하였다. 이어서, 상층액인 혈청을 4°C에서 밤새 배양하여 다른 나머지 응혈 물질을 완전히 응축시키고 10,000 xg에서 20분간 원심분리하고 남은 상층액을 따로 모아 분획하여 실험에 사용할 분량의 혈청은 4°C에 보관하고 나머지는 - 20°C에서 냉동 보관하였다.

단계 3: 간접 ELISA (Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay)를 이용한 항- PB14₄ Ab의 역가 측정

단계 2에서 얻어진 혈청 시료들을 이용하여 항체 역가를 측정하였다. 96 웰 분석 플레이트 (Falcon : pro- binding)에 PB1₄ 펩타이드 용액(10 µg/ml in PBS)을 100 µl씩 넣은 후, 4°C에서 6시간 이상 방치하고, TTBS(0.05% Tween 20 함유 Tris 완충식염수)로 3번 세척하였다. 각 웰당 블로킹 용액 (1 % BSA in TTBS)을 200 µl씩 넣은 후, 37°C에서 1시간 반응시키고 TTBS로 3번 세척하였다. 분리한 혈청을 블로킹 용액에 10⁻² - 10⁻⁵ 배로 희석하여 100 µl씩 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시키고 TTBS 200 µl로 3번 세척하였다. HRP- 결합 염소 항- 토끼 IgG 항체(Pierce, Rockford, IL)를 블로킹 용액에 10⁻³ 배로 희석하여 100 µl씩 넣고, 37°C에서 1시간 반응시킨 후, TTBS 200 µl로 3번 세척하였다. 호스래디쉬 퍼옥시다제 기질 키트 (Bio- Rad)의 용액 A와 용액 B를 9:1로 섞어 100 µl씩 넣은 후 상온에서 30분간 발색반응을 시킨 후 ELISA 리더 (EL312e, Bio- Tek Ins.)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 9). 도 9로부터 PB1₄ 펩타이드에 대한 마우스 항혈청이 1000배(그림의 X축의 3.0)의 희석도까지 웨스턴 및 ELISA 실험에 적용될 수 있음을 확인하였다.

< 실시예 6>

마우스 모델을 이용한 PB14₄ 백신의 항 비만 효과

단계 1: 마우스에서의 비만 유도

본 실험에서는 5주령 스킷 ICR계 마우스((주) 대한동물실험센터, 서울, 대한민국)를 이용하였고 마우스는 17- 25°C로 유지되는 동물 사육실에서 혼합사료[(주) 삼양사료 (Seoul, Korea) 제품, 성분: 수분 11.8% 이상, 단백질 20.0% 이상, 조지방 3.0% 이상, 조섬유 10.0% 이하, 조회분 10.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상]로 사육하였다.

마우스에서 비만을 유도하기 위하여 골드티오글루코스(goldthioglucose: GTG)를 투여하여 시상하부 섭식조절 중추핵(venteromedial hypothalamic nuclei; VMH)의 병변을 유도하여 이로써 만족감을 느끼지 못하고 계속적으로 먹이를 섭취하여 비만이 유도되도록 하였다. 실험에서 사용한 GTG는 매우 불안정한 화합물이고 물 또는 수분이 존재하면 서로 분리(dissociation)되며 흡습성이 있다. 따라서, 원하는 양의 GTG를 주사하기 위해서 브레처 등(Brecher G. and Waxler, S. H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 70: 498- 501(1949))의 방법과 동일하게 100 mg의 GTG(Sigma사)를 1 ml의 참기름(Sigma사)에 현탁하여 사용하였다.

실험군(20 마리)과 대조군(4마리)으로 나누고, 실험군에는 GTG를 각각 25 mg씩 주사하였으며 대조군은 정상 상태로 두었다.

실험 실시예 앞서 마우스의 체중을 측정했는데 체중 오차가 크지 않은 마우스를 선정하여 사육하고 실험대상으로 적용하였다. GTG 주사 후 일부 마우스가 약 일주일 이내에 사망한다고 보고되어 있기 때문에, 실험에 사용된 마우스의 체중은 개별적으로 측정하지 않고 GTG 주사로부터 일주일 후에 측정하였다. 이때 마우스의 체중은 약 26.5 내지 29.5 g 범위였다.

실험군은 GTG를 주사한지 1주일 후에 7 마리에서 비만이 유도되었고, 나머지 13마리 마우스는 비만이 유도되지 않아 상기와 동일한 방법으로 GTG 주사를 재실시하여 모두 비만이 유도되었으며, 이들을 세 그룹으로 나누었다. 이 중 한 그룹(실험군 1; 7 마리)의 마우스에게는 두 번째 GTG 주사 1주일 후 실시예 3의 단계 2에서와 같이 PB1₄ 펩타이드를 이용하여 백신주사를 실시하였다. 또한, 두 번째 그룹(실험군 2; 7 마리)의 마우스에게는 PB1₄ 펩타이드 백신주사 대신에 운반체 단백질로 사용한 오브알부민을 주사하여 모의 실험(mock experiment)을 실시하였고, 마지막으로 세 번째 그룹(실험군 3; 6마리)의 경우에는 비만이 유도되도록 백신주사를 하지 않았다.

한편, 대조군 마우스(정상군)에는 PBS 0.2 ml를 주사하여 비교 대상으로 삼았다.

또한, 콜레스테롤 섭취를 유도하여 마우스 혈청내의 콜레스테롤 수치를 높이기 위하여 GTG를 주사할 때부터 마우스 사료에 계란 노른자위를 혼합하여 50°C에서 건조시킨 후 제공하였으며, 콜레스테롤에 의한 질병을 유도하거나 비만을 유도하기 위하여 많은 양의 먹이를 공급하였다. 각 마우스의 체중은 매일 측정하였다.

그 결과, 도 10에서 보는 바와 같이, 백신을 주사한 실험군 1(-▲-▲-)의 마우스들은 GTG 주사 12주 후 체중은 27.7 ± 0.4 g에서 52.2 ± 1.7 g으로 증가하여 증가 정도에 있어 정상 대조군(-○-○-)의 체중증가와 비교하여 큰 차이가 없었다. 그러나 비만을 유도한 후 오브알부민을 주사한 실험군 2(-●-●-)와 비만을 유도한 후 백신주사를 전혀 하지 않은 실험군 3(-■-■-)의 경우에는 지속적으로 체중이 증가되어 28.3 ± 0.5 g에서 68.9 ± 2.8 g으로 현저한 체중 증가를 보이고 있다. 따라서 PB1₄ 펩타이드를 백신 주사함으로 비만이 억제되는 것을 확연히 구분할 수 있었다.

도 10에서, G1 및 G2는 GTG 주사를 나타내고, V1, V2 및 V3는 PB1₄에 의한 백신 주사를 나타낸다.

한편, 도 11은 비만 유도 후 백신 주사의 효과를 마우스의 외관을 이용하여 보인 그림으로 GTG를 주사한 후, 백신을 주사한 실험군 1의 20 주령의 마우스(도 11a: 정상 체형)와 백신을 접종하지 않은 실험군 3의 20주령의 마우스(도 11b: 비만 체형)를 비교하여 실질적 비만억제 효과를 나타내었다.

단계 3: 혈중 콜레스테롤 농도 측정

첫번째 GTG 주사후 12주째에 대조군 마우스와 GTG 주사된 마우스(실험군 1 및 2)를 대상으로 혈중 콜레스테롤 수치를 비교하였다. 혈중 총 콜레스테롤, 트리글리세리드, HDL- 콜레스테롤 및 LDL- 콜레스테롤 농도는 각각 Cholesterylme- V, Triglyzyme- V, HDL- C555(신양화학, 서울, 대한민국) 및 LDL- EX 키트(Denka 生研(株), 도쿄, 일본)를 이용하여 효소학적으로 측정하였다. 이때 실험적 오차를 줄이기 위하여, 매 실험마다 표준시료 Calibrator- D(Denka 生研(株), 도쿄, 일본)를 이용하여 각 O.D.값에 대한 검량선식 그래프를 작성하였으며, 측정하고자 하는 시료의 O.D. 값을 대입하여 지질 농도와 함량을 분석하였다. 그 결과는 하기 표 1 및 도 12와 같다.

[표 1]

	총 콜레스테롤	TG	HDL- C	LDL- C
대조군	79 ± 3.7	180± 26	59± 3.4	6± 1.2
실험군 1	118 ± 3.6	217± 47	92± 4.7	20± 1.7
실험군 2,3	131 ± 8.8	218± 70	119± 7.5	30± 4.5
TG: 트리글리세리드, HDL- C: HDL- 콜레스테롤, LDL- C: LDL- 콜레스테롤				

표 1 및 도 12로부터 볼 수 있는 바와 같이, GTG 주사를 통한 비만의 유도 결과, 전반적으로 총 콜레스테롤, 트리글리세리드, HDL- C, LDL- C 농도가 모두 약간씩 상승되어 있으나, 대조군과 실험군에서 모두 콜레스테롤 함량에서 큰 차이를 보이지 않았다(도 12).

발명의 효과

아포지단백질 B- 100의 에피토프에 대한 모조 펩타이드, 그의 연쇄물 또는 변형체를 함유하는 본 발명의 비만 치료용 백신 조성물은 생체 내에서 자가면역 질환을 일으키지 않으면서도 비만의 발생을 효과적으로 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 백신을 사용하면 지금까지 LDL 관련 순환기 질환을 막기 위해 사용되던 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 대사 관련 효소를 저해하는 일시적이고 고비용이 소모되는 방식에 비해 효과적이고 간편하게 비만을 예방할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열 번호 1로 표시되는 아포지단백질 B- 100(Apolipoprotein B- 100)의 에피토프의 모조 펩타이드 및 이들의 연쇄물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 연쇄물이, 상기 모조펩타이드가 1 내지 15개 연결된 연쇄물인 것을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 연쇄물이, 상기 모조 펩타이드가 4개 연속해서 연결된 연쇄물인 것을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 아미노산 서열이 결손, 추가 또는 화학적 치환으로 변형된 것임을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 5.

서열 번호 2로 표시되는 아포지단백질 B- 100의 에피토프의 모조 펩타이드.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 연쇄물이, 상기 모조 펩타이드가 1 내지 15개 연결된 연쇄물인 것을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 7.

제 5항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 연쇄물이, 상기 모조 펩타이드가 4개 연속해서 연결된 연쇄물인 것을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 8.

제 5항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 아미노산 서열이 결손, 추가 또는 화학적 치환으로 변형된 것임을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 9.

서열 번호 3으로 표시되는 아포지단백질 B- 100의 에피토프의 모조 펩타이드.

청구항 10.

제 9항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 연쇄물이, 상기 모조 펩타이드가 1 내지 15개 연결된 연쇄물인 것을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 11.

제 9항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 연쇄물이, 상기 모조 펩타이드가 4개 연속해서 연결된 연쇄물인 것을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 12.

제 9항에 있어서, 상기 모조 펩타이드의 아미노산 서열이 결손, 추가 또는 화학적 치환으로 변형된 것임을 특징으로 하는 모조 펩타이드.

청구항 13.

아포지단백질 B- 100의 에피토프의 서열번호 1로 표시되는 모조 펩타이드와 그의 연쇄물 또는 변형체, 서열번호 2로 표시되는 모조 펩타이드와 그의 연쇄물 또는 변형체, 서열번호 3으로 표시되는 모조 펩타이드와 그의 연쇄물 또는 변형체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것들을 함유하는 것을 특징으로 하는 비만증 치료용 백신 조성물.

청구항 14.

제 13항에 있어서, 상기 백신 조성물이 피내 주입(intradermal injection) 제형인 것을 특징으로 하는 비만증 치료용 백신 조성물.

청구항 15.

제 13항에 있어서, 상기 백신 조성물이 정제, 환제, 과립제, 분말, 새세이, 엘렉실제, 현탁제, 유제, 액제, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀제, 멸균 주사액 및 멸균 분말로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형인 것을 것을 특징으로 하는 비만증 치료용 백신 조성물.

청구항 16.

1) 서열번호 1 내지 3으로 표시되는 아포지단백질 B- 100의 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 암호화하는 DNA를 벡터에 삽입하는 단계;

- 2) 단계 1)의 벡터를 사용하여 균주를 형질 전환시킨 후 배양하는 단계; 및
 - 3) 단계 2)에서 배양된 균주로부터 상기 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체를 분리하는 단계;
- 를 포함하는 모조 펩타이드, 그들의 연쇄물 또는 변형체의 제조 방법.

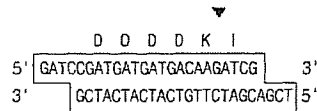
청구항 17.

서열번호 1로 표시되는 아포지단백질 B- 100의 모조 펩타이드가 4개 연속으로 연결된 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA.

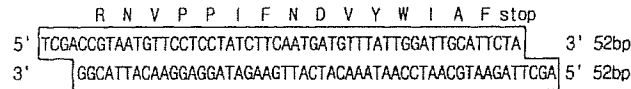
청구항 18.

서열번호 1로 표시되는 아포지단백질 B- 100의 모조 펩타이드가 4개 연속으로 연결된 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 발현 벡터.

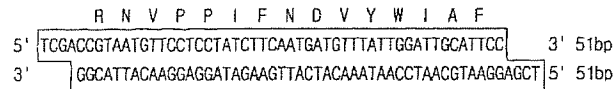
도면 1a



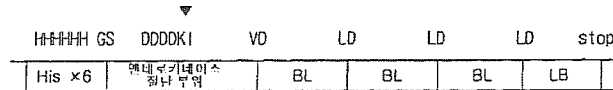
도면 1b



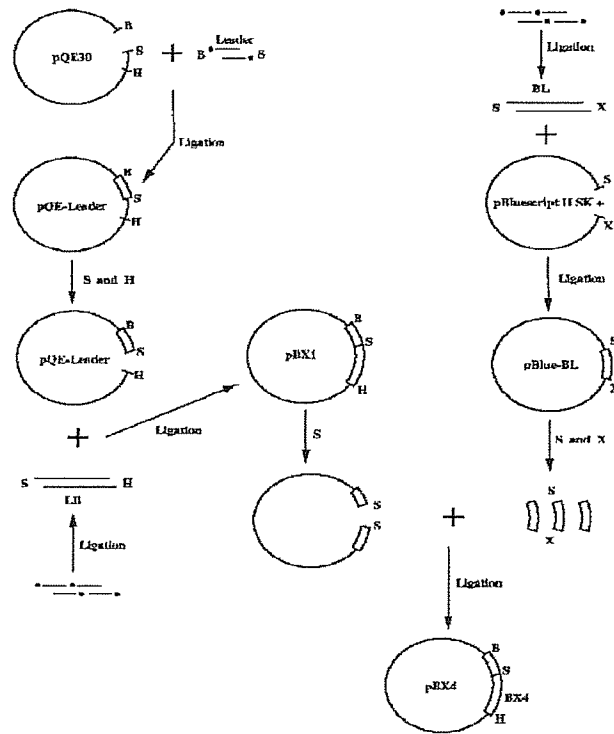
도면 1c



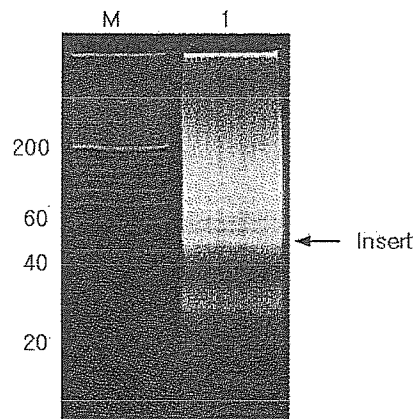
도면 1d



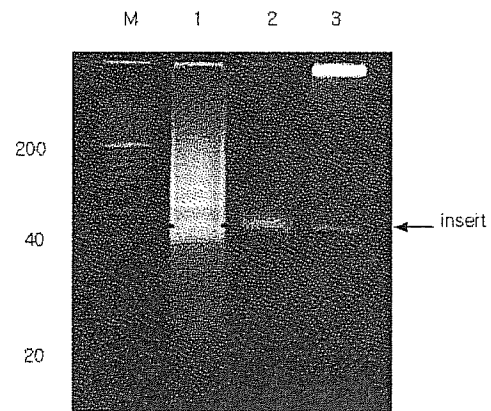
도면 2



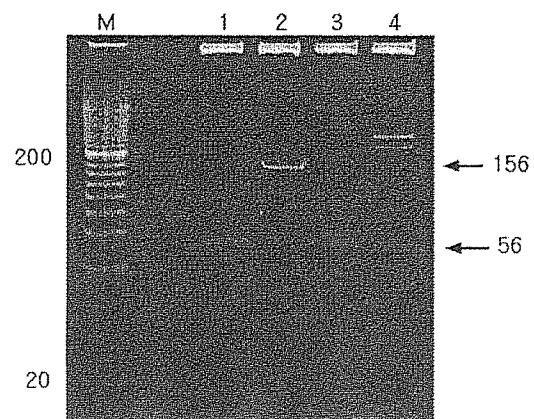
도면 3



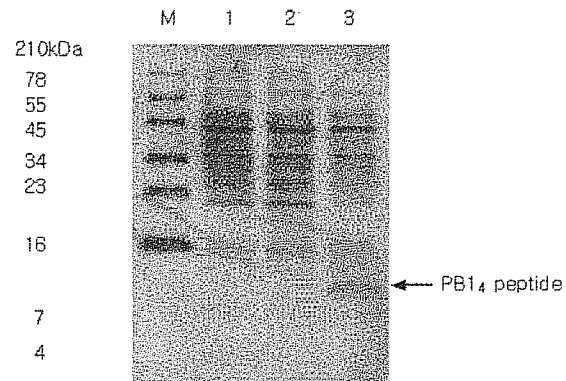
도면 4



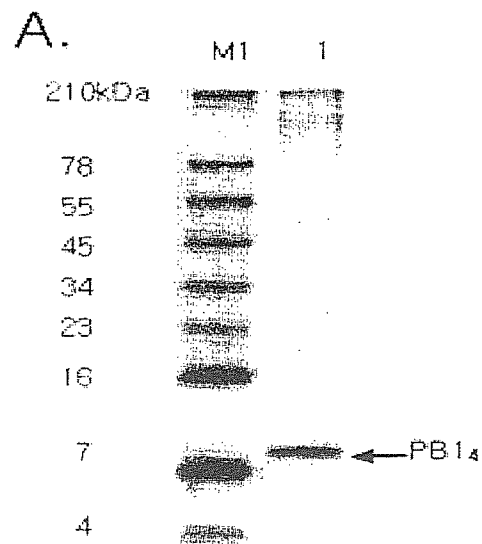
도면 5



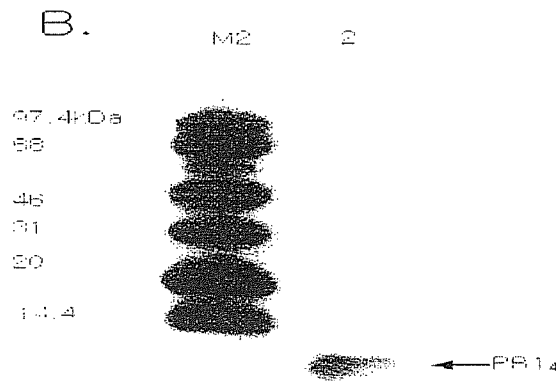
도면 6



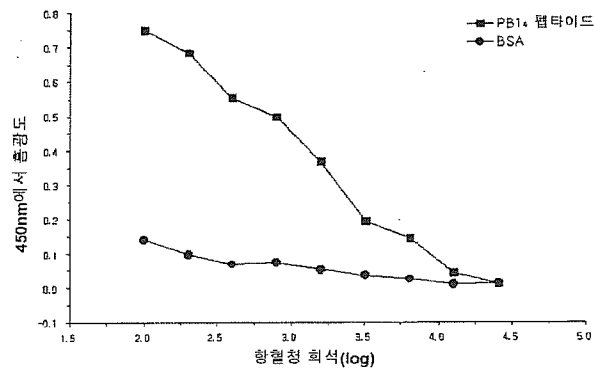
도면 7



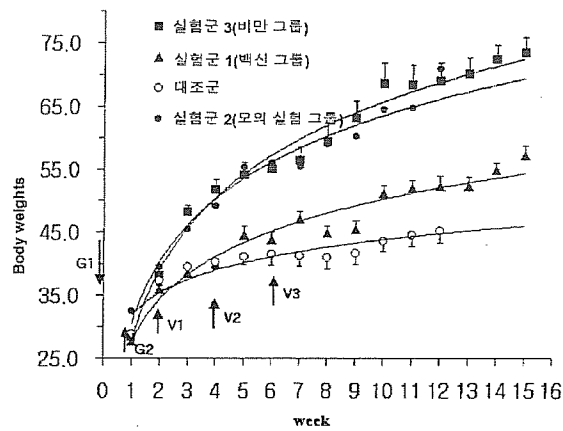
도면 8



도면 9



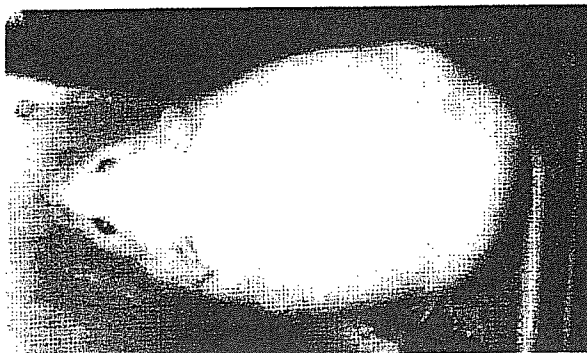
도면 10



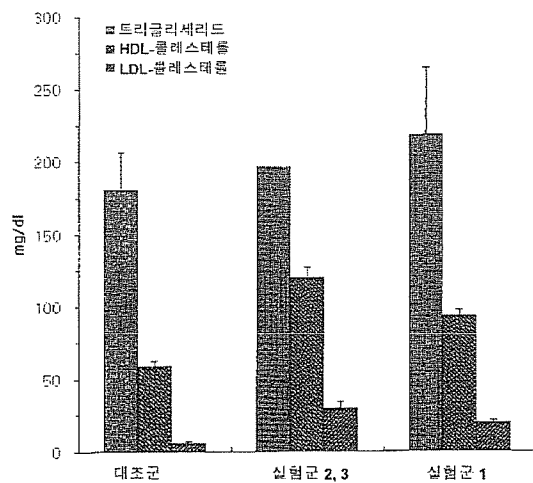
도면 11a



도면 11b



도면 12



<110> KIM, Hyo Joon
 <120> Mimetic peptides for epitope of apolipoprotein B-100, concatemer and derivatives thereof, and the vaccine composition comprising the same
 <130> SJPA0103
 <150> KR10-2000-0052055
 <151> 2000-09-04
 <160> 16
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mimetic peptide for apolipoprotein B-100
 <400> 1
 Arg Asn Val Pro Pro Ile Phe Asn Asp Val Tyr Trp Ile Ala Phe
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mimetic peptide for apolipoprotein B-100
 <400> 2
 Arg Phe Arg Gly Leu Ile Ser Leu Ser Gln Val Tyr Leu Asp Pro
 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> mimetic peptide for apolipoprotein B-100
 <400> 3
 Ser Val Cys Gly Cys Pro Val Gly His His Asp Val Val Gly Leu
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide for the construction of BL or LB cassette
 <400> 4
 tcgaccgtaa tggtcctcct atc
 <210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide for the construction of BL or LB cassette

23

<400> 5
 atcattgaag ataggaggaa cattacgg 28
 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide for the construction of LB cassette
 <400> 6
 ttcaatgatg tttattggat tgcattcta 29
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide for the construction of LB cassette
 <400> 7
 agcttagaat gcaatccaat aaac 24
 <210> 8
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide for the construction of BL cassette
 <400> 8
 ttcaatgatg tttattggat tgcattcc 28
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> oligonucleotide for the construction of BL cassette
 <400> 9
 tcgaggaatg caatccaata aac 23
 <210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> upper strand of the leader cassette
 <400> 10
 gatccgatga tgatgacaag atcg 24
 <210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> lower strand of the leader cassette
 <400> 11
 tcgacgatct tgtcatcatc atcg 24

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> enterokinase cleavage site
 <400> 12
 Asp Asp Asp Asp Lys Ile
 1 5
 <210> 13
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> upper strand of the LB cassette
 <400> 13
 tcgaccgtaa tgttcctcct atcttcaatg atgtttattg gattgcattc ta 52
 <210> 14
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> lower strand of the LB cassette
 <400> 14
 agcttagaat gcaatccaat aaacatcatt gaagatagga ggaacattac gg 52
 <210> 15
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> upper strand of the BL cassette
 <400> 15
 tcgaccgtaa tgttcctcct atcttcaatg atgtttattg gattgcattc c 51
 <210> 16
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> lower strand of the BL cassette
 <400> 16
 tcgaggaatg caatccaata aacatcattg aagataggag gaacattacg g 51